

звука 880 кГц уменьшение в растворе нитрита становится заметным только при достаточно высокой концентрации глюкозы –  $5 \cdot 10^{-2}$  М.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что воздействие на водные растворы ультразвуком *in vitro* с частотой 3200 кГц приводит к уменьшению наработки свободных радикалов, что может быть использовано в клинической практике у больных с повышенным содержанием оксида азота в крови. Применение ультразвука с частотой 880 кГц может вызвать возрастание в крови  $\text{NO}_2^-$  даже при физиологических концентрациях глюкозы и привести к локальному повреждению тканей, и, в частности, эндотелия сосудов.

Таким образом установлено, что концентрация глюкозы в крови может существенно модифицировать наработку NO, что следует учитывать при назначении УЗ процедур при сахарном диабете.

#### *Литература*

1. Palmer, R.M.J., Bridge, L., Foxwell, N.A., and Moncada, S.- Br. J. Pharmacol. –1992. – V.105. - P.11-12.
2. Saad A.H., Bahakim H.M., Helmi A., Bashaandi A.M., Lim L.K. Ultrasound Med. Biol.- 1986. –V.12. - P.855-863.
3. Гришанова А.Ю., Зуева Т.В. // Билирубин как эндогенный посредник в активации экспрессии *cyp1a1* под действием ультразвука // Вопросы медицинской химии. - 2000.- № 2.
4. Эльпинер И.Е. Биофизика ультразвука.- М.: Наука.- 1973.
5. Мецлер Д. Биохимия. - М.: Мир, 1980.-Т.3.- С.1500.

## **БИОХИМИЧЕСКИЕ И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У КРЫС**

**Шабанов П.Д., Ключева Н.Н., Мещеров Ш.К.**

*Российская военно-медицинская академия, г. Санкт-Петербург*

Многие патологические состояния, характеризующиеся нарушением обучения и памяти (в результате сосудистых, травматических, инфекционных заболеваний, старения), сопровождаются значительными изменениями липидного обмена и прежде всего холестерина. Данных о значении нарушений липидного обмена в генезе мнестических расстройств сравнительно немного. В большинстве своем это клинико-психологические наблюдения, действительно показывающие снижение памяти лиц с выраженным атеросклерозом мозговых сосудов [4-6]. С другой стороны, существует довольно большая литература о влиянии условнорефлекторной деятельности на липидный обмен [1, 2]. В ней

демонстрируется, что разные условные рефлексы, как правило, повышают содержание холестерина (ХС), триглицеридов, фосфолипидов,  $\beta$ -липопротеидов в крови подопытных животных (собаки, кролики, крысы), однако, эти изменения определяются лишь спустя 3-4 недели после начала обучения и, вероятно, могут быть связаны не с самим процессом выработки рефлекса, а с адаптацией животного к новым условиям жизнедеятельности [2]. Таким образом, отсутствие четких экспериментальных доказательств нарушений обучения и памяти у животных с измененным липидным обменом и продиктовало задачу настоящего исследования – изучение влияния гиперхолестеринемии (ГХС) на формирование и угашение питьевого условного рефлекса (ПУР) у крыс.

### *Материалы и методы исследования*

Опыты выполнены на 240 крысах самцах Вистар с начальной массой 130-150 г. У животных вызывали ГХС содержанием их на диете, в состав которой входили 2%-ный ХС в подсолнечном масле и 0,4%-ная дегидрохолевая кислота. Животных исследовали спустя 30 дней (ГХС<sub>I</sub>), 55-65 дней (ГХС<sub>II</sub>) и 90 дней (ГХС<sub>III</sub>) от начала кормления. Контролем служили крысы того же возраста, содержащиеся на обычном пищевом рационе (стандартный брикетированный корм) в течение всего времени экспериментов. О развитии ГХС судили по возрастанию ХС в сыворотке крови животных. Кровь на определение ХС брали из хвостовой вены крыс. Спустя 1-2,5 месяца после содержания животных на атерогенной диете проводили обучение ПУР [6] параллельно с контрольными крысами. Для этого животных, предварительно лишенных на 48 ч воды, обучали потреблять воду в ответ на появление условного сигнала (свет) в однокорректной автоматизированной камере. Ежедневно крысам предъявляли 20 сочетаний условного и безусловного сигналов по схеме: 10 сек свет плюс вода, затем 40 сек без света и воды. Продолжительность сеанса обучения составляла около 14 минут. После обучения всем животным предоставлялась вода *ad libitum* на 20 минут. Критерием обучения служило выполнение не менее 70% правильных ответов. Продолжительность обучения ПУР не превышала 10 дней. Затем рефлекс угашали до критерия не более 10% правильных ответов. Для биохимических опытов продолжительность обучения составляла 2 суток. В последнем случае выбор столь короткого по времени варианта обучения ПУР определялся тем, что более 60-70% крыс обучаются данному рефлексу в течение 2-3 суток, а также известными фактами возможного изменения уровня ХС сыворотки крови при продолжительном обучении условному рефлексу [2]. В результате двухдневного обучения ПУР условно было выделено по 4 группы контрольных и экспериментальных

животных: 1) интактные крысы, содержащиеся на обычном пищевом рационе ( $K_n$ ); 2) контроль на состояние жажды – крысы, содержащиеся на обычном пищевом рационе, которым не давали пить в течение 48 ч ( $K_{ж}$ ); 3) обучившиеся (достигшие критерия обучения) крысы, содержащиеся на обычном пищевом рационе ( $K_o$ ); 4) необучившиеся крысы, содержащиеся на обычном пищевом рационе ( $K_n$ ); 5) крысы, содержащиеся на атерогенной диете ( $ГХС_n$ ); 6) крысы, содержащиеся на атерогенной диете, которым не давали пить 48 ч ( $ГХС_{ж}$ ); 7) обучившиеся (достигшие критерия обучения) крысы, содержащиеся на атерогенной диете ( $ГХС_o$ ); 8) необучившиеся крысы, содержащиеся на атерогенной диете ( $ГХС_n$ ). По окончании процедуры обучения всем крысам предоставляли воду на 20 минут, после чего их декапитировали. В сыворотке крови каждого животного определяли содержание общего ХС и триглицеридов на автоанализаторе АА-2 фирмы Technicon (США), а также изучали липопротеидный спектр крови [1]. В печени исследовали содержание общего ХС [1]. Из серого вещества мозга выделяли синаптические мембраны, в которых измеряли уровень ХС, фосфолипидов и активность  $Na, K$ -АТФазы [3]. Данные обрабатывали статистически с использованием  $t$ -критерия Стьюдента.

### *Результаты и их обсуждение*

Содержание ХС в сыворотке крови крыс на ГХС диете сроком 1-3 месяца существенно увеличивает концентрацию ХС сыворотки крови. Однако после 4-дневной отмены атерогенной диеты уровень ХС сыворотки значительно снижался и не превышал 1,607 ммоль/л к концу первого месяца кормления, 1,781 ммоль/л к концу второго и 2,083 ммоль/л к концу третьего месяца. До отмены атерогенной диеты эти значения составляли 2,043, 2,847 и 4,680 ммоль/л соответственно. Такое снижение ХС сыворотки уже через два дня после отмены диеты обнаружено и другими авторами [2]. Поэтому возникла необходимость дать дополнительную характеристику полученной ГХС у этих животных. С этой целью было проведено определение содержания ХС в печени и изучение спектра липопротеидов сыворотки крови крыс (интактные и ГХС). Было найдено, что у контрольных крыс концентрация ХС в печени составляет 10,4 мкмоль/г ткани, в то время как у  $ГХС_I$  животных (кормление ХС в течение 30 дней) – 32,2 мкмоль/г, у  $ГХС_{II}$  (55-65 дней кормления ХС) – 40,8 мкмоль/г, а у  $ГХС_{III}$  (90 дней кормления ХС) – 51,5 мкмоль/г ткани, т.е. в последнем случае увеличилось почти в 5 раз. Таким образом, повышение содержания ХС в сыворотке крови и печени (табл. 1) указывает на развитие ГХС у крыс, содержащихся на атерогенной диете (ХС и дегидрохолевая кислота).

Таблица 1

**Уровни липидов в сыворотке крови и печени интактных  
и ГХС крыс, отобранных по признаку обучения**

Группа крыс	Сыворотка крови		Печень
	Концентрация ХС (ммоль/л)	Концентрация ТГ (ммоль/л)	ХС (мкмоль/г ткани)
<b>Интактные</b>	1,312±0,081	0,344±0,047	10,4±0,5
<b>Обучившиеся</b>			
ГХС 10 дней	1,264±0,089	0,322±0,041	13,5±1,3*
ГХС 20 дней	1,361±0,122	0,311±0,052	39,1±2,3**
ГХС 30 дней	1,409±0,088	0,282±0,064	38,4±2,1**
<b>Необучившиеся</b>			
ГХС 10 дней	1,864±0,231*	0,636±0,043*	12,4±1,8
ГХС 20 дней	1,953±0,102*	0,320±0,044	45,9±2,3**
ГХС 30 дней	1,792±0,073*	0,511±0,049*	41,0±0,8**

Примечание:  $P < 0,05$ ;  $P < 0,01$  по отношению к интактным животным.

Наблюдалось также изменение у крыс с ГХС и в липопротеидном спектре крови. Ультрацентрифугирование липопротеидов сыворотки крови в градиенте плотности бромистого калия выявило увеличение фракции липопротеидов низкой плотности. При исследовании ХС синаптических мембран этот показатель достоверно не менялся у животных, находившихся на атерогенной диете. Содержание фосфолипидов (ФЛ) синаптических мембран достоверно уменьшается уже через месяц атерогенной диеты. Вследствие этого уменьшается молярное отношение ХС к ФЛ. Однако это практически не отражается на активности Na,K-АТФазы. Некоторое снижение активности фермента до 10,58 мкмоль Р<sub>и</sub>/ (мг белка в ч) (в контроле 11,15) после двухмесячного кормления ХС не было достоверным. Таким образом, в целом ГХС незначительно отразилась на концентрации ХС синаптических мембран и активности Na,K-АТФазы. Однако при решении другой задачи исследования – изучении зависимости обучения крыс от степени ГХС – мы обнаружили более интересные биохимические сдвиги как в содержании ХС сыворотки крови и синаптических мембран, так и в активности фермента.

Как было сказано ранее, все контрольные и крысы с ГХС делились на 4 группы. Если рассматривать биохимические показатели внутри каждой группы отдельно, выявляются следующие закономерности. В контрольной группе животных содержание ХС и ФЛ синаптических

мембран, а также активность Na,K-АТФазы не изменялись независимо от того, обучались крысы или нет. Однако обнаружены достоверные различия в концентрации ХС сыворотки между обучившимися и необучившимися животными, хотя эти значения ХС в обеих группах и не выходят за пределы нормы (табл. 2). Если у обучившихся крыс значение ХС сыворотки находилось на нижней границе нормы (составляло 1,261 ммоль/л), то у необучившихся крыс эти значения ХС были на верхней границе (1,596 ммоль/л). Та же закономерность наблюдается и у крыс с ГХС между обучившимися и необучившимися животными. Различия в содержании ХС сыворотки после одного месяца атерогенной диеты между ГХС<sub>о</sub> и ГХС<sub>н</sub> составляли 30% (1,334 и 1,919 ммоль/л соответственно), после двух месяцев кормления ХС эти различия были еще более выражены (1,422 и 2,194 ммоль/л соответственно). В этих же группах животных появляются различия и в содержании ХС синаптических мембран. В группе обучившихся крыс происходит накопление ХС в мембранах, хотя и не очень значительное (ГХС<sub>ю</sub> и ГХС<sub>юо</sub> – 304,2 и 319,8 нмоль ХС на мг белка соответственно) по сравнению с группой необучившихся животных (ГХС<sub>ин</sub> – 231,4, ГХС<sub>инн</sub> – 262,6 нмоль ХС на мг белка). Коэффициент ХС/ФЛ у этих животных также возрастает.

Появляются изменения в активности Na,K-АТФазы. При ГХС<sub>1</sub> активность фермента у обучившихся крыс выше, чем активность у необучившихся животных (13,52 и 10,25 мкмоль Р<sub>н</sub>/мг белка в час соответственно), а при ГХС<sub>II</sub> активность фермента у обучившихся крыс, напротив, снижена по сравнению с контролем и с группой обучившихся животных (ГХС<sub>юо</sub> – 8,17; ГХС<sub>юж</sub> – 11,29; ГХС<sub>ин</sub> – 10,46 мкмоль Р<sub>н</sub>/мг белка в час). Если некоторое увеличение активности Na,K-АТФазы после одного месяца кормления крыс ХС у обучившихся животных по сравнению с необучившимися (но не с интактным контролем) может быть обусловлено какими-либо компенсаторными реакциями организма, то достоверное снижение активности фермента у обучившихся крыс после двухмесячного атерогенного рациона происходит, по-видимому, за счет стабильного увеличения содержания ХС в синаптических мембранах мозга и коэффициента ХС/ФЛ (0,694 против 0,550). Как было показано, это снижение активности Na,K-АТФазы по влиянию ХС синаптических мембран мозга, накапливающегося при ГХС, подобно ингибирующему действию ХС на активность этого фермента в экспериментах *in vitro*. Полученные результаты соответствуют данным ряда авторов, которые обнаружили обратную зависимость между активностью Na,K-АТФазы и уровнем ХС (или индексом ХС/ФЛ) в клеточных мембранах [1, 3].

Таблица 2

**Концентрация ХС в сыворотке крови, содержание ХС и ФЛ, а также активность Na,K-АТФазы в синаптических мембранах мозга крыс, находившихся на атерогенной диете, при обучении ПУР**

Группа крыс	Концентрация ХС в сыворотке, ммоль/л	Содержание ХС в мембранах, нмоль/мг белка	Содержание ФЛ в мембранах, нмоль/мг белка	Молярное отношение ХС/ФЛ	Активность Na,K-АТФазы, мкмоль Р <sub>n</sub> /мг белка в ч
<b>Контрольные группы</b>					
<i>K<sub>n</sub></i>	1,474±0,099	273,0±20,8	669,1±46,9	0,408	11,40±1,64
<i>K<sub>ж</sub></i>	1,503±0,109	236,6±15,6	612,9±32,2	0,386	9,85±1,12
<i>K<sub>о</sub></i>	1,261±0,073*	241,8±13,0	659,8±49,6	0,368	11,53±0,92
<i>K<sub>n</sub></i>	1,596±0,088	267,8±13,0	676,2±34,8	0,396	11,82±1,-3
<b>Атерогенная диета в течение 35 дней</b>					
ГХС <sub>ln</sub>	1,607±0,135	254,8±10,4	584,4±22,8	0,436	14,44±1,01
ГХС <sub>лж</sub>	1,518±0,112	262,6±13,0	573,4±16,1	0,458	12,51±2,10
ГХС <sub>lo</sub>	1,334±0,047**	304,2±23,4*	571,8±52,3	0,532	13,52±0,73*
ГХС <sub>ln</sub>	1,919±0,117	231,4±23,4	471,3±12,1	0,491	10,25±0,88
<b>Атерогенная диета в течение 55-65 дней</b>					
ГХС <sub>ln</sub>	1,781±0,091	270,4±10,4	556,3±21,4	0,486	10,38±0,47
ГХС <sub>лж</sub>	1,750±0,088	278,2±13,0	505,8±38,9	0,550	11,29±0,76
ГХС <sub>lo</sub>	1,422±0,023*	319,8±5,2*	460,8±45,6	0,694	8,17±0,63*
ГХС <sub>ln</sub>	2,194±0,073	262,6±18,2	477,8±25,5	0,550	10,46±0,84

Примечание: \*P<0,05; \*\*P<0,01 по отношению к необучившимся животным.

В опытах по изучению влияния ГХС на обучение крыс ПУР найдено, что животные с ГХС обучаются медленнее, чем контрольные крысы. В то же время выработанный рефлекс у животных с ГХС угашается значительно быстрее, чем в контроле. Наиболее наглядно это видно после двух месяцев нахождения крыс на атерогенной диете. Крысы с ГХС обучаются ПУР очень медленно, причем различия в скорости обучения контрольных и животных с ГХС определяются уже в первые дни выработки рефлекса (на 2-3 день). За 10 дней обучения только 44±15% крыс с ГХС достигли критерия обучения против 75±16% в контроле. При этом указанный процент обучившихся крыс в контрольной группе зарегистрирован уже на шестые сутки обучения. Вместе с тем, и это особен-



но важно подчеркнуть, угашение ПУР у животных с ГХС происходит почти вдвое быстрее, чем в контроле. Для угашения рефлекса при этом требуется  $2,0 \pm 0,6$  дней и  $3,5 \pm 0,7$  дней у ГХС и контрольных крыс соответственно.

Следует отметить, что степень нарушения обучения ПУР находится в прямой зависимости от продолжительности атерогенной диеты. Как было указано выше, для выяснения некоторых биохимических особенностей липидного обмена у животных с ГХС мы использовали короткие курсы обучения ПУР (по 2 дня) что позволило разделить животных на быстро и медленно обучающихся (не достигших критерия обучения за данный период времени). После 35-дневного кормления ХС процент крыс, обучившихся за 2 дня, был сравнительно невысок: в первый день обучения в контроле и опытной группе он составил соответственно  $14 \pm 8\%$  и  $25 \pm 8\%$ , во второй день –  $41 \pm 11\%$  и  $43 \pm 10\%$ . При этом достоверных различий между обеими группами не отмечено. Указанный факт связан, вероятно, с адаптацией животных к экспериментальной ситуации. В дальнейшем, к 55 дню кормления ХС в контрольной группе этот показатель не отличался от интактных животных и составлял ко второму дню обучения  $67 \pm 17\%$ . На этом фоне ярче проявляются различия между контрольными крысами и животными с ГХС. На второй день обучения количество правильных ответов и межсигнальных реакций в группе с ГХС достоверно снижалось, а общее число ответов до достижения критерия обучения (70% правильных ответов) соответственно возрастало. Еще более значимые различия между указанными группами животных наблюдали через 65 дней кормления ХС. Процент обучившихся крыс с ГХС составлял лишь  $6 \pm 6$  против  $40 \pm 16$  в контроле, более чем в 2 раза уменьшилось количество правильных ответов и межсигнальных реакций, причем достоверные различия отмечены и в первый и во второй дни обучения. Невысокий процент обучившихся животных в контрольной группе ( $40 \pm 16\%$ ) связан с увеличением числа крыс, не давших ни одного правильного ответа за два дня обучения, что обусловлено, по-видимому, длительностью эксперимента (более двух месяцев).

Следует особо подчеркнуть, что различия у крыс в контрольной и в группе с ГХС проявлялись несмотря на чрезвычайно короткий период обучения (2 дня). Это указывает на значительные изменения в высшей нервной деятельности животных, происходящие при развитии экспериментальной ГХС. Также неодинаково они выявляются в зависимости от срока обучения на первый и второй день. Первый день обучения, по сути, характеризует кратковременную память (продолжительность сеанса обучения около 14 минут), а второй – возможность использования полученной информации в экспериментальной ситуации, т.е. консолидацию памяти. Поэтому уже в первые два дня обучения мы наблюдаем

выраженные нарушения памяти, которые нарастают с увеличением срока атерогенной диеты.

Таким образом, на примере мнестических расстройств, обусловленных гиперхолестеринемической (атерогенной) диетой, мы можем проследить основные черты так называемого старческого типа нарушений памяти [6], а именно: сниженную способность к обучению и ускоренное забывание приобретенной информации. Подобные расстройства памяти наиболее четко определяются у старых животных, а также в прогериятрических моделях старения, имитирующих процессы естественного старения. Последние вызывают облучением животных лучами Рентгена, их нахождением на диете без витамина Е, введением дигидрохатистерола,  $\beta$ -аминопропионитрила, твина-80, ХС в сочетании с витамином Е, некоторыми другими факторами [5, 6]. Очевидно, что сами модели существенно отличаются друг от друга по патогенезу, однако их объединяет одно свойство – однотипные нарушения высшей нервной деятельности, по характеру близкие к таковым у старых животных. Указанное обстоятельство не только позволяет использовать прогериятрические модели для исследования закономерностей старения, но и применять в качестве тестов для изучения действия фармакологических веществ, потенциально оптимизирующих высшие функции мозга у животных и человека.

#### *Литература*

1. Ключева Н.Н., Рыженков В.Е., Сапронов Н.С. Возможность экспериментального индуцирования гиперхолестеринемии у крыс с трудно выработанным питьевым условным рефлексом // Рос. физиол. журн. - 1997. - Т.83, №3. - С.107-111.
2. Лазаренко Н.С., Хананашвили М.М., Рыженков В.Е. Содержание липидов в крови у собак, выращенных в условиях изоляции // Физиол. журн. СССР-1980. - Т.66, №10. - С.1537-1539.
3. Рожанец В.В., Козлова В.П., Розина Р.И., Швец В.И., Глебов Р.Н. Действие противосудорожных веществ на Na,K-АТФазу синаптических мембран головного мозга // Биохимия. - 1978. - Т.43, №5. - С.892-898.
4. Роль старения нервных клеток в нейропатологии. Докл. исследоват. группы ВОЗ // ВОЗ. Сер. техн. докл. 665. ВОЗ: Женева, 1983. - С.1-90.
5. Хомуло П.С. Эмоциональное напряжение и атеросклероз.- Л.: Медицина, 1982. - 152 с.
6. Шабанов П.Д., Бородкин Ю.С. Нарушения памяти и их коррекция. - Л.: Наука, 1989- С.150.